

Étude des chlamydozoaires chez quelques espèces de *Phytophthora* de Bory

par S. RIOU et A. RAVISÉ



RÉSUMÉ

Cette étude porte sur la recherche des conditions de formation, de conservation et de germination des chlamydozoaires chez diverses espèces de *Phytophthora*. Les chlamydozoaires apparaissent après une ou deux semaines de culture, avant l'épuisement des réserves nutritives. Leur formation est indépendante de l'éclaircissement et de la composition du milieu. Les chlamydozoaires peuvent germer dès leur formation sur des substrats variés. Les thalles qu'elles produisent possèdent tous les caractères des souches dont elles proviennent. Après une période de conservation d'une durée variable, une partie des chlamydozoaires ne germe plus sans qu'aucune modification cytologique soit décelable; la nature de ce phénomène n'a pas été élucidée.



Parmi les Pythiacées parasites des plantes cultivées, les espèces appartenant au genre *Phytophthora* de Bory sont à la fois largement répandues dans toutes les régions tropicales, pathogènes pour de nombreux hôtes et particulièrement sensibles à un environnement défavorable. Les diverses souches que nous avons étudiées ont un comportement identique à celui mis en évidence par plusieurs chercheurs pour de nombreux échantillons (2, 3, 9, 10). Aucune souche de *Phytophthora* ne peut survivre à une exposition de quelques heures à une température de 37° C. De même, toutes les souches ne supportent pas la sécheresse. Elles ont besoin, pour réaliser leur cycle, de substrats beaucoup plus complexes que les *Pythium*. Et pourtant ces parasites peuvent en de courtes périodes provoquer des pertes importantes sur des cultures aussi diverses que le cacaoier, l'hévéa, les agrumes, les tomates, le tabac. Ils disparaissent lorsque les conditions ambiantes leur deviennent défavorables puis réapparaissent brusquement à grande échelle, comme par exemple le *P. meadii* Mc Rae et le *P. palmivora* Bull. sur feuillage de l'hévéa à Ceylan. Leurs thalles ne comportent que deux types d'organes de conservation, d'une part les chlamydozoaires et les sporocystes enkystés dont la morphologie paraît proche, et d'autre part les oospores produites par les souches homothaliques et par la confrontation de la plupart des souches hétérothaliques de signes complémentaires.

C'est pourquoi nous avons pensé qu'il était utile d'étudier les conditions de formation et de conservation des chlamydozoaires de *Phytophthora* car celles-ci interviennent probablement pour une grande part dans la dissémination et la survie de ces champignons.

Les expériences ont été réalisées avec 18 souches appartenant à 9 espèces correspondant à 4 des 6 groupes morphologiques dans lesquels Waterhouse (24) a rassemblé

les *Phytophthora*. Ces souches proviennent d'hôtes très différents et de régions fort éloignées. Leur choix a été motivé par le désir d'éviter l'interférence d'éventuelles adaptations géographique ou parasitaire avec le processus étudié. Le tableau n° 1 indique la nature et la provenance des souches éprouvées. Les études furent réalisées avec des clones d'origine monozospore, en principe monocaryotiques, afin de diminuer les causes de variabilité. Elles portèrent sur les conditions de formation des chlamydospores *in vitro*, en particulier la composition du milieu de culture, les modalités de leur germination et quelques aspects de leur survie.

ETUDE DES CONDITIONS DE FORMATION DES CHLAMYDOSPORES

La production de chlamydospores par les 18 souches mentionnées ci-dessus fut étudiée sur 10 milieux de culture synthétiques ou naturels. Ceux-ci sont des décoctions de farine d'avoine, de petit pois dont certaines séries additionnées de 10 % de lait de coco, de pomme de terre avec ou sans β -sito-stérol à 20 ppM, de papaye. Ceux-là correspondent à un milieu minimum (1) et à trois variantes respectivement additionnées de thiamine à 0,5 ppM, de thiamine et d'hydrolysate de caséine, de ces deux éléments associés à 20 ppM de β -sito-stérol. Les milieux de culture furent employés soit liquides soit gélifiés à 10, 15, 20 grammes par litre pour obtenir des substrats de consistance croissante. Des résultats équivalents furent obtenus dans ces différentes conditions qui étaient également destinées à déterminer les modalités de culture les plus favorables à la séparation des chlamydospores.

TABLEAU I

Liste des souches de *Phytophthora* utilisées pour l'étude des chlamydospores

Souches	Espèces	Hôtes	Origines	Souches	Espèces	Hôtes	Origines
29 629	<i>P. heveae</i>	Hévea	Ceylan	567	<i>P. parasitica</i>	Oranger	Congo
1379	<i>P. syringae</i>	Sol	Nouvelle-Zélande	573	<i>P. parasitica</i>	Oranger	Congo
U	<i>P. cactorum</i>	Tomate	Maroc	1352	<i>P. citrophthora</i>	Oranger	Maroc
A	<i>P. palmivora</i>	Cacaoyer	Côte-d'Ivoire	1388	<i>P. capsici</i>	Capsicum	New Mexico
K	<i>P. palmivora</i>	Oranger	Côte-d'Ivoire	1474	<i>P. drechsteri</i>	<i>Chrysanthemum</i>	Italie
L	<i>P. palmivora</i>	Aubergine	Côte-d'Ivoire	1470	<i>P. cinnamomi</i>	<i>Cinnamomum</i>	Sumatra
350	<i>P. palmivora</i>	Cacaoyer	Congo	G	<i>P. cinnamomi</i>	Avocatier	Côte-d'Ivoire
570	<i>P. palmivora</i>	Oranger	Congo	163	<i>P. cinnamomi</i>	Avocatier	Congo
1930	<i>P. parasitica</i>	<i>Nigella</i>	Ile Maurice	721	<i>P. cinnamomi</i>	Papayer	Congo

(1) Composition du milieu minimum : $MgSO_4 \cdot 7H_2O$: 0,2 g ; K_2SO_4 : 0,5 g ; KNO_3 : 0,5 g ; $CaCO_3$: 0,2 g ; K_2HPO_4 : 0,2 g ; $H_2K_2PO_4$: 0,8 g ; $FeSO_4 \cdot 5H_2O$: 0,5 mg ; $Zn SO_4 \cdot 7H_2O$: 0,5 mg ; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$: 0,02 mg ; $MnCl_2 \cdot 7H_2O$: 0,02 mg ; $TiSO_4 \cdot 5H_2O$: 0,02 mg ; $Mo_2O_7(NH_4)_6 \cdot 4H_2O$: 0,02 mg ; glucose : 10 g.

Le tableau n° 2 indique les résultats obtenus au cours de ces essais.

Plusieurs caractères s'avèrent constants. Aucun d'entre eux n'est particulier à une espèce mais ils sont dans l'ensemble stables pour chaque souche.

Parmi les souches de *P. cinnamomi* testées, trois ne produisent jamais de chlamydospores, la quatrième en forme sur des milieux riches, décoctions gélées d'avoine ou de petit pois, cette dernière additionnée de lait de coco, et sur milieu synthétique additionné de 4 acides aminés : le glycocole, la serine, la proline et la phénylalanine. A l'exception de deux souches, une de *P. palmivora* et celle de *P. cinnamomi* indiquée ci-dessus, la production de chlamydospores est possible sur un milieu nutritif simple comportant des sels minéraux, un sucre et de la thiamine. La présence de ce facteur de croissance est indispensable.

La précocité d'apparition des chlamydospores semble, pour un milieu donné, caractéristique de chaque souche. Suivant les cas, les premières chlamydospores furent décelées entre le 7^e et le 14^e jour de culture. Le plus souvent, surtout pour deux souches de *P. palmivora* (K et J), elles se forment d'abord dans le mycélium aérien et sont indifféremment intercalaires ou terminales. Par rapport au *Pythium splendens* qui différencie des chlamydospores entre 24 et 36 heures après l'ensemencement, les souches de *Phytophthora* ont une évolution lente. Le groupement de l'apparition des chlamydospores pour les souches éprouvées incite à envisager l'hypothèse que leur formation correspond à un stade de développement du thalle. Une certitude résulte de ces observations : les chlamydospores apparaissent bien avant l'épuisement des réserves du milieu. Pour la plupart des souches étudiées et quel que soit le milieu de culture, le nombre de chlamydospores augmente pendant deux à trois semaines, ensuite la densité du thalle ne permet pas d'apprécier des variations qui semblent peu importantes. Au cours de ces essais, l'aptitude à produire des chlamydospores en plus ou moins grandes quantités est apparue comme un caractère stable. Ainsi pour les souches de *P. palmivora* trois d'entre elles (A, L, 570) en forment beaucoup, une (K) relativement peu, une autre enfin (350) très rarement.

Ces résultats indiquent la plasticité des souches qui peuvent former des organes de conservation sur des milieux très différents contenant soit les substances indispensables, comme les milieux synthétiques mentionnés ci-dessus, soit des réserves importantes comme les décoctions d'avoine ou de pois. Nous avons indiqué que la présence de thiamine est indispensable (16). Pour les éléments nutritifs il semble que les proportions relatives de substances carbonées et azotées interviennent dans la production des chlamydospores comme l'indique le tableau n° 3. Les expériences ont été réalisées pour 14 souches avec deux sources d'azote, l'une minérale (nitrate de potassium), l'autre organique (hydrolysate de caséine). Quatre rapports C/N furent testés : 100/1, 50/1, 20/1, et 5/1. Les observations furent effectuées après deux semaines de culture à 26° C.

Nous avons déjà indiqué ci-dessus que les souches de *P. cinnamomi* éprouvées ne produisent pas de chlamydospores sur des milieux synthétiques. Ce comportement est constant quel que soit le rapport C/N variant de 100,1 — sauf celle de *P. drechsleri* — à 20/1. L'optimum semble se situer suivant les souches à 50/1 ou à 20/1. Par contre, pour la valeur de C/N = 5/1 toutes les souches présentent des anomalies morphologiques, une croissance désordonnée et les chlamydospores formées sont très rares, souvent anormales. Les différentes valeurs du rapport C/N correspondent probablement à toutes les conditions réalisables dans la nature : substrats pauvres en hydrates de carbone tels que ceux utilisés au cours de la phase saprophytique, milieux plus favorables constitués par les divers tissus végétaux vivants.

La comparaison des tableaux n° 1 et n° 3 tend à impliquer que l'aptitude à former des chlamydospores et sa plasticité sont indépendantes de la plante-hôte et de l'origine géographique des souches. En outre, il est apparu au cours d'autres expériences que la formation de sporocystes et la reproduction sexuée se réalisent seulement pour une gamme plus restreinte des valeurs de C/N.

TABLEAU II

Vitesse de formation des chlamydospores de diverses espèces de *Phytophthora* en fonction du milieu nutritif

Souches	<i>P. heveae</i> 29 629	<i>P. syringae</i> 1 379	<i>P. cactorum</i> U	<i>P. palmivora</i>				
				A	K	L	350	570
Décoction d'avoine	2 ^e semaine	2 ^e semaine	2 ^e semaine	Rares à 10 jours	Rares à une semaine accroissement entre 20 ^e et 30 ^e jour	Rares à 2 semaines accroissement la 4 ^e semaine	Très rares à 2 semaines	Vers 10 ^e jour nombreuses à 2 semaines
Décoction de pois	Vers 10 jours	Début : 8 ^e jour nombreuses à 15 jours	Rares à 12 jours augmentent dès 15 ^e jour	Au 8 ^e jour nom- breuses à 2 semaines	Rares à une semaine puis accroissement	Dans mycélium aérien à une semaine	2 semaines	Vers 10 ^e jour à 2 semaines nom- breuses
Décoction de pois et lait de coco			Entre 2 ^e et 3 ^e semaine	Vers 12 ^e jour	Vers 10 ^e jour	Peu nombreuses à 10 jours		A 2 semaines
Décoction de papaye				2 semaines	A 2 semaines	Peu nombreuses à 3 semaines		Rares vers 14 ^e jour
Décoction de pomme de terre	2 ^e semaine	Au 12 ^e jour	2 ^e semaine	A 10 jours	Vers 11 ^e jour	Vers 11 ^e jour	Absentes ou rares à 2 semaines	Vers 12 ^e jour
Décoction de pomme de terre et β -sito-stérol	Vers 10 jours	Rares à 10 jours	Vers 10 ^e jour	A 8 jours	A une semaine très nombreuses à la 3 ^e semaine	Vers 8 ^e jour	2 ^e semaine	A 1 semaine
Milieu synthétique	Sans	Saus	Sans	Sans	Sans	Sans	Sans	Sans
Milieu synthétique avec thiamine	Rares à 2 semaines	Entre le 10 ^e et le 14 ^e jour	2 semaines	A 8 jours	A une semaine puis accroissement	A une semaine nom- breuses après 3 semaines	Sans	Vers 10 ^e jour
Milieu synthétique avec thiamine et et hydrolysat de caséine	Rares à 2 semaines		A 3 ^e semaine	A 10 jours	Vers 10 ^e jour	Vers 8 ^e jour	Rares 2 ^e semaine	Vers 10 ^e jour
<i>Idem</i> avec β -sito- stérol	Vers 10 jours		Nombreuses à 3 semaines	A 8 jours	Vers 10 ^e jour	Vers 8 ^e jour	Rares 2 ^e semaine	Vers 10 ^e jour

TABLEAU II (suite)

Vitesse de formation des chlamydospores de diverses espèces de *Phytophthora* en fonction du milieu nutritif.

Souches	<i>P. parasitica</i>			<i>P. citrophthora</i> 1352	<i>P. capsici</i> 1 388	<i>P. drechsteri</i> 1 474	<i>P. cinnamomi</i>			
	1930	567	573				1 470	G	721	163
Décoction d'avoine	Vers 12 ^e jour	A 10 jours	10 jours	Rares à 3 semaines	Rares à 1 semaine puis accroissement	Début vers 2 ^e semaine (très rares)	Sans	Rares à un mois	Sans	Sans
Décoction de pois	Vers 10 ^e jour	10 jours	1 semaine	Rares à 2 semaines	A 1 semaine nombreuses à 2 semaines	Très rares à 2 semaines	Sans	Sans	Sans	Sans
Décoction de pois et lait de coco			Nombreuses à 10 jours		Nombreuses 10 ^e jour	Très rares à 2 semaines	Sans	3 semaines	Sans	Sans
Décoction de papaye	2 ^e semaine	2 semaines	Entre 2 ^e et 3 ^e semaine	Sans	1 semaine	Sans	Sans	Sans	Sans	Sans
Décoction de pomme de terre	A 2 semaines	2 semaines	A 10 jours	Rares à 2 semaines	11 ^e jour	Rares à 3 semaines	Sans	Sans	Sans	Sans
Décoction de pomme de terre et β -sito-stérol	A 10 jours	A 10 jours	1 semaine	Vers 12 ^e jour	Vers 9 ^e jour	Rares à 2 semaines	Sans	Sans	Sans	Sans
Milieu synthétique	Sans	Sans	Sans	Sans	Sans	Sans	Sans	Sans	Sans	Sans
Milieu synthétique avec thiamine	Vers 10 ^e jour	Rares à 2 semaines	Vers 2 ^e semaine	Vers 12 ^e jour	Vers 10 ^e jour nombreuses la 3 ^e semaine	Sans	Sans	Sans	Sans	Sans
Milieu synthétique avec thiamine et hydrolysate de caséine	Vers 10 ^e jour	Rares à 2 semaines	Vers 10 ^e jour	Vers 12 ^e jour	2 ^e semaine puis accroissement	Sans	Sans	Sans	Sans	Sans
<i>Idem</i> avec β -sito-stérol	Vers 10 ^e jour	Vers 10 ^e jour	Vers 10 ^e jour	Vers 12 ^e jour	Vers 8 ^e jour	Sans	Sans	Sans	Sans	Sans

TABLEAU III

Influence du rapport C/N sur la production de chlamydospores
Légende: + : présence, ++ : nombreuses chlamydospores, - : absence

Rapports N/C Souches	Milieu contenant de l'azote minéral NO ₃ K				Milieu contenant de l'azote organique (hydrolysats de caséine)			
	100/1	50/1	20/1	5/1	100/1	50/1	20/1	5/1
(<i>P. heveae</i>) 29 629	- rares	+	+	-	+rares	+	.	
(<i>P. palmivora</i>) A	+	+	+	+rares	+	++	+	+
K	+	+	+	+rares	+	+	+	+rares
L	-	-	++	+rares	+	+	++	-
570	-	-	-	- rares	+	+	+	+rares
(<i>P. parasitica</i>) 1930	+	+(+)	-	- rares	+	++	+	mal formées
567	+	+	+	+rares	+	++	+	+très rares
573	-	-	+	+rares	-	+	+rares	-
(<i>P. capsici</i>) 1388	-	-	+	+	-	++	+++	- vésicules
(<i>P. drechsleri</i>) 1474	-	-	-	-	-	+	+	-
(<i>P. cinnamomi</i>) 721	-	-	-	-	-	-	-	-
1470	-	-	-	-	-	-	-	-
G	-	-	-	-	-	-	-	-
163	-	-	-	-	-	-	-	-

L'influence des facteurs externes sur la production des chlamydospores a été recherchée au cours d'essais concernant l'incidence de la température et de l'éclairement.

Les sept souches ci-après : K et L de *P. palmivora*, 573 de *P. parasitica*, 1388 de *P. capsici*, G de *P. cinnamomi*, U de *P. cactorum*, 1379 de *P. syringae* furent cultivées sur les quatre milieux synthétiques, sur décoctions de farine d'avoine, de papaye, de petit pois additionnée de lait de coco, chaque série étant scindée en deux lots ; l'un d'eux était maintenu à l'obscurité, l'autre éclairé pendant 12 heures sur 24. Les observations furent échelonnées entre la 1^{re} et la 5^e semaine de culture. Aucune différence qualitative n'a été décelée, les variations de densité des chlamydospores nous ont paru à la fois peu importantes et trop irrégulières pour que des comptages puissent en rendre compte.

Si l'éclairement n'influe pas directement sur la formation des chlamydospores, l'incidence de la température semble notable pour 2 souches de *P. palmivora*, A et K.

TABLEAU IV

Germination des chlamydospores

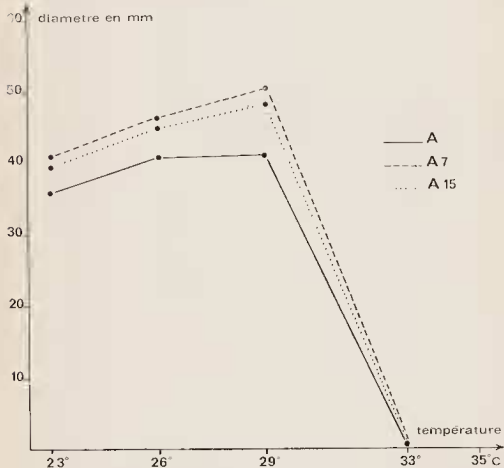
Souches	Milieu de culture	Age	Nombre	Mode de séparation	Milieu de germination	Taux de germination
A (<i>P. palmivora</i>)	Pois gélosé	2 semaines	20	Micro-manipulateur	Goutte pendante pois liquide	1/20 germé en 3 jours ; transfert sur pois gélosé : 6/19 en 48 heures puis 3 avant 8 ^e jour
A	Milieu synthétique thiamine liquide +	3 semaines	40	Broyage 45 secondes	Milieu synthétique + thiamine gélosé	20 sur 20 en 24 heures
(<i>P. palmivora</i>) K	Milieu synthétique thiamine liquide +	3 semaines	20	Broyage 45 secondes	Milieu synthétique thiamine gélosé +	20 sur 20 en 24 heures
K	Milieu synthétique thiamine liquide +	3 semaines	20	Broyage 1 minute	Pois + lait coco gélosé	20 en 24 heures
K	Milieu synthétique thiamine gélosé +	3 semaines	40	Broyage 1 minute	Pois gélosé	35 en 24 heures et 5 en 48 heures
K	Avoine gélosé	6 semaines	20	Broyage 1 minute	Eau gélosé	9 en 48 heures 11 en 96 heures 12 en 15 jours
K	Avoine gélosé	6 semaines	20	Broyage 1 minute	Milieu synthétique thiamine gélosé	12 en 24 heures 15 en 96 heures 17 en 15 jours
(<i>P. palmivora</i>) K	Milieu synthétique thiamine gélosé +	2 mois	20	Broyage 1 minute	Pois gélosé et lumière	20 en 3 jours
K	Milieu synthétique thiamine gélosé +	2 mois	20	Broyage 1 minute	Pois gélosé obscurité	15 en 3 jours
K	Avoine gélosé	2 mois et germé	13	Broyage 1 minute	Pois gélosé	5 en 24 heures 13 en 48 heures
(<i>P. palmivora</i>) L	Avoine gélosé	2 mois	14	Micro-manipulateur	Goutte pendante milieu pois	3 en goutte pendante puis après transfert sur pois gélosé : 8 en 48 heures et 2 en 4 jours

TABLEAU IV (suite)

Germination des chlamydospores

Souches	Milieu de culture	Age	Nombre	Mode de séparation	Milieu de germination	Taux de germination
L	Avoine gélosé	2 mois	20	Broyage 1 minute	Avoine gélosé	10 en 3 jours puis série infectée lors observations
L	Avoine gélosé	2 mois	22	Broyage 1 minute	Pois gélosé	20 en 2 jours
(<i>P. palmivora</i>) 570	Milieu synthétique thiamine liquide +	3 semaines	18	Broyage 1 minute	Pois et lait de coco gélosé	18 en 24 heures
(<i>P. parasitica</i>) 573	Pois gélosé	2 semaines	10	Micro-manipulateur	Goutte pendante de pois liquide	Pas de germination après transfert 6 en 24 heures
573	Pois gélosé	3 semaines	20	Broyage 1 minute	Pois gélosé	20 en 24 heures
573	Milieu synthétique gélosé	3 semaines	20	Broyage 1 minute	Pois gélosé	20 en 24 heures
573	Pois gélosé	1 mois	20	Broyage 1 minute	Pois gélosé	12 en 4 jours et 8 infectées par bactéries
573	Pois gélosé	4 semaines	83	Broyage 45 secondes	Pois gélosé	70 en 48 heures et boîtes infectées lors observations
573	Milieu synthétique et hydrolysat caséine gélosé +	5 semaines	10	Micro-manipulateur	Goutte pendante pois liquide	Aucune germination
573	Milieu synthétique thiamine gélosé +	5 semaines	80	Broyage 1 minute	Pois gélosé	37 en 24 heures 49 en 48 heures
(<i>P. capsici</i>) 1388	Milieu synthétique thiamine liquide +	5 semaines	20	Broyage 45 secondes	Pois gélosé	4 en 48 heures 5 en 5 jours

Les essais ont été réalisés sur des milieux géosés contenant des décoctions de farine d'avoine puis de pomme de terre, après une phase initiale de croissance à 26° C pendant 3 jours, les observations étant effectuées tous les 2 jours. Des chlamydo-spores ont été décelées à 26° C vers le 7^e jour, à 29° C entre le 12^e et le 14^e jour. Pour les températures plus basses, 20° C et 23° C, la production de chlamydo-spores était plus lente, de l'ordre de 2 semaines, au-dessus de 30° C il n'y en eut pas. Ces résultats semblent indiquer qu'il existe une certaine relation entre la production des chlamydo-spores et l'intensité des synthèses matérialisée par la croissance radiale du micromycète en fonction de la température (graphique 1).



ETUDE DE LA GERMINATION DES CHLAMYDOSPORES *in vitro*

La réalisation de ce travail a nécessité la mise au point de techniques de séparation des chlamydo-spores lésant aussi peu que possible leurs parois et leurs cytoplasmes mais détruisant complètement les hyphes. Deux méthodes furent employées. L'une consiste en une adaptation d'un processus de séparation des sporocystes utilisé en 1964 à l'aide d'un hrochage modéré des thalles suivi de filtrations sur des tamis à mailles de diamètre décroissant, toutes les manipulations étant effectuées aseptiquement. Les chlamydo-spores recueillies dans les culots de filtration étaient triées sous microscope puis transportées sur les milieux de germination, chaque emplacement étant repéré. Pour la seconde méthode, on utilisa le micromanipulateur de de Fonbrune ; les chlamydo-spores étaient séparées en chambre à huile, au microscope, et placées dans des

TABLEAU V

Taux de germination des chlamydo-spores à partir de la 4^e semaine (séparation par broyage)

Souche	Milieu de culture	Age	Nombre	Milieu de germination	Taux de germination
<i>(P. parasitica)</i> 573	Pois gélosé	4 semaines	20	Pois gélosé	12 en 4 jours
573	Pois gélosé	4 semaines	83	Pois gélosé	70 en 48 heures
573	Milieu synthétique + thiamine gélosé	5 semaines	80	Pois gélosé	37 en 24 heures 49 en 48 heures
<i>(P. capsici)</i> 1388	Milieu synthétique liquide	5 semaines	20	Pois gélosé	4 en 48 heures 5 en 5 jours
<i>(P. palmivora)</i> K	Avoine gélosé	6 semaines	20	Milieu synthétique + thiamine gélosé	12 en 24 heures 15 en 96 heures 17 en 15 jours
K	Avoine gélosé	6 semaines	20	Eau gélosée	9 en 48 heures 11 en 96 heures 12 en 15 jours
K	Milieu synthétique + thiamine gélosé	8 semaines	20	Pois gélosé (lumière)	20 le 3 ^e jour
K	Milieu synthétique + thiamine gélosé	8 semaines	20	Pois gélosé (obscurité)	15 le 3 ^e jour
K	Avoine gélosé	10 semaines	13	Pois gélosé	5 en 24 heures 13 en 48 heures
L	Avoine gélosé	8 semaines	20	Avoine gélosé	10 en 3 jours
L	Avoine gélosé	8 semaines	22	Pois gélosé	20 en 48 heures

microgouttes de milieu nutritif. Cependant, le taux de germination étant faible dans ces conditions à cause de la faible tension en oxygène, il s'avéra nécessaire de transporter les chlamydozoospores à la micropipette sur des milieux gélosés. Aussi ce procédé de séparation ne fut-il utilisé que pour vérifier les résultats obtenus par l'autre méthode. Compte non tenu des nombreuses séries préliminaires, l'étude de la germination porta sur 570 chlamydozoospores dont 51 séparées au micromanipulateur.

Le tableau n° 4 indique la répartition des essais et les résultats obtenus.

Ni la nature des souches ni leur origine n'influent sur le comportement des chlamydozoospores. De même la nature du milieu de culture sur lequel elles ont été produites n'a pas d'incidence sur leur germination. Nous avons indiqué qu'en milieu liquide, sous faible tension d'oxygène, la germination est mauvaise. Celle-ci semble pouvoir s'effectuer normalement sur tout milieu nutritif en atmosphère saturée d'humidité et à une température proche de l'optimum de croissance des espèces tropicales de *Phytophthora*.

Seul le taux de germination sur eau gélosée est faible. Ainsi, pour les souches étudiées, la plasticité concerne non seulement la production mais aussi la germination des chlamydozoospores.

Par contre, le taux de germination paraît évoluer avec l'âge des chlamydozoospores. Celles-ci sont aptes à engendrer un thalle dès leur formation, en apparence sans exception, dans les 24 heures suivant leur séparation du thalle et leur transfert dans des conditions favorables. À partir de la 4^e semaine et suivant les souches, les délais de germination augmentent pour atteindre 2 à 3 jours et une partie des chlamydozoospores ne germe pas. Le tableau n° 5 indique cette évolution en fonction des souches et de la durée de conservation. Aucune modification morphologique décelable au microscope optique n'apparaît en même temps que la réduction du taux de germination.

Ce processus, commun à plusieurs espèces de *Phytophthora*, pourrait intervenir dans la conservation des souches au cours d'alternances de phases favorables et défavorables à leur vie active. Les observations ci-dessus sont trop fragmentaires pour qu'une hypothèse puisse être formulée sur la nature du phénomène observé qui, *a priori*, ressemblerait à une dormance.

ÉTUDE COMPARATIVE DES LIGNÉES PROVENANT DE LA GERMINATION DE CHLAMYDOZOOSPORES ET DES SOUCHES INITIALES

L'expérimentation a porté sur trois éléments : la variation éventuelle des caractères morphologiques, la comparaison des vitesses de croissance radiales à différentes températures, la conservation des aptitudes à la reproduction sexuée.

Les lignées issues de la germination des chlamydozoospores, à l'exception de celles infectées par les bactéries (cf. tableau n° 4) furent maintenues en culture à 26° C pendant 2 semaines afin de vérifier si la vitesse de croissance, les caractères morphologiques, la formation des organes de reproduction asexuée et de conservation étaient identiques à ceux des souches initiales. Aucune différence n'a été décelée.

Des vérifications plus approfondies furent réalisées avec quinze lignées de la souche A et 23 lignées de la souche K, toutes deux appartenant au *P. palmivora*. Cultivées alternativement sur milieu synthétique additionné de thiamine, et sur décoction de pois gélosé soit en tubes, soit en boîte de Petri, ces 38 lignées ne présentèrent aucune modification de caractère.

L'étude de la croissance radiale pour des températures comprises entre 23° C et 35° C concerna seulement 6 lignées de la souche K et 5 de la souche A. Seules des différences quantitatives minimes furent décelées par rapport aux courbes de croissance de clones monozoospores préparés à partir de ces souches quelques mois auparavant.

Le graphique n° 1 représente les courbes de croissance obtenues pour un clone de la souche A et pour 2 lignées issues de la germination de chlamydo-spores.

Les deux souches A et K sont interfertiles. Quinze lignées issues de chaîne d'elles furent confrontées en même temps que deux clones monozospores de A et de K. Après 10 jours d'incubation à 20° C et à l'obscurité, toutes les confrontations avaient produit de nombreux zygotes. Il n'existait pas de différences morphologiques entre les zygotes produits dans la confrontation des deux clones et celles formées par des lignées. Il n'a pas été procédé à des essais de germination des zygotes.

ÉTUDE DE LA CONSERVATION DES CHLAMYDOSPORES SÉPARÉES DU THALLE

Ces essais avaient pour objectif de préciser les possibilités de survie des chlamydo-spores à l'intérieur d'un fragment de thalle ou séparées, dans des conditions proches de celles réalisées dans la nature au cours de la vie saprophytique ou même d'un arrêt de la vie active.

Cinq souches furent utilisées : trois de *P. palmivora* (K, L, 350) une de *P. parasitica* (567) et une de *P. cinnamomi* (G). Sur des cultures âgées de 2 semaines furent prélevés 120 échantillons pour chacun des motifs ci-dessous :

- chlamydo-spores détachées des hyphes, placées sur des cubes d'eau gélifiée ;
- des groupes d'hyphes ne portant pas de chlamydo-spores, également déposés sur des cubes d'eau gélifiée ;
- des fragments de culture ayant respectivement 2 mm et 6 mm de côté.

La moitié de chaque série, soit 60 échantillons, était placée au contact d'un fragment de racine de papayer stérilisé.

Puis tous les échantillons furent répartis, à raison de cinq par boîte de Petri, sur de la terre calibrée au tamis à mailles d'un millimètre, saturée d'eau et stérilisée à 120° C pendant 2 heures. Les échantillons furent conservés dans des récipients étanches pour éviter toute déshydratation, à 20° C pendant 6 semaines. Puis chaque boîte de Petri reçut un film de milieu nutritif, de la décoction de petit pois, et fut placée à 26° C pendant 10 heures.

Aucun cas de reprise d'activité végétative n'a été décelé pour la série des hyphes séparées. De même aucune des 600 chlamydo-spores transportées dans la terre avec ou sans fragment végétal, n'a germé. Par contre, une partie des fragments de culture placés dans les mêmes conditions ont formé de nouveaux thalles peu après l'apport de milieu nutritif.

Ces résultats diffèrent sensiblement de ceux obtenus *in vitro* pour une durée de conservation équivalente.

La probabilité de survie de fragments d'hyphes placés dans la terre était quasi nulle, certainement non négligeable pour ceux se trouvant à côté d'un fragment de racine de papayer, plante-hôte des trois espèces testées. Si l'évolution des chlamydo-spores avait été identique à celle observée *in vitro*, il aurait dû y avoir un pourcentage élevé de germination malgré les alevés dus aux transferts successifs. Il n'a pas été possible de déterminer par un examen au microscope si les chlamydo-spores étaient enkystées ou mortes. La reprise irrégulière de la vie active des fragments de thalles, indépendamment de leur taille, tendrait à indiquer qu'une partie des chlamydo-spores ont conservé, comme elles du même âge étudiées *in vitro*, l'aptitude à germer lorsque sont réunies des conditions favorables.

Ces résultats tendraient à confirmer que les chlamydo-spores, après une période relativement courte pendant laquelle toutes sont susceptibles de germer, s'enkysteraient ou entreraient en dormance et qu'une faible proportion d'entre elles pourraient alors donner naissance à un thalle nouveau même si toutes les conditions externes favorables étaient réunies.

CONCLUSION

Pour les espèces de *Phytophthora* dont 18 souches ont été étudiées, la formation de chlamydospores intervient dès les premiers stades de la croissance du thalle, le plus souvent avant celle des sporocystes et des oospores. Elle se réalise aussi bien sur des milieux synthétiques simples que sur des substrats complexes et riches en éléments nutritifs. Quelle que soit la composition du milieu de culture, pour chaque souche, le délai d'apparition des chlamydospores varie dans de faibles proportions, ceci implique l'hypothèse que le mécanisme de formation pourrait correspondre à un stade de développement du thalle indépendamment des réserves encore disponibles dans le milieu nutritif.

D'autre part, si les chlamydospores peuvent toutes germer dès leur formation, il semble apparaître après des temps de conservation variant suivant les souches de 4 à 8 semaines, une modification qui entraverait la germination. Cette évolution n'est pas optiquement décelable et elle ne concerne qu'une partie des chlamydospores comme l'indiquent les 2 séries d'essais réalisés *in vitro*.

Des observations portant sur la morphologie des thalles, la vitesse de croissance, le maintien de la fertilité, indiquent que, dans le cadre de ces expériences, les chlamydospores transmettent lors de leur germination les caractères décelables des souches dont elles sont issues.

Les chlamydospores germant peu après leur formation se comportent de la même façon que des sporocystes germant directement. Toutefois, il semble exister une différence entre ces deux organes. Alors que les sporocystes ne résistent pas à un échauffement ou à une déshydratation modérés, les chlamydospores peuvent germer après une exposition de quelques heures à des conditions défavorables. Malgré une différenciation morphologique en apparence peu importante, ces chlamydospores pourraient donc assurer la survie et la dissémination au cours de périodes courtes alternativement défavorables ou propices au champignon lorsqu'il ne se trouve pas abrité dans les tissus d'une plante-hôte.

La connaissance des mécanismes impliqués dans l'évolution des chlamydospores de *Phytophthora* permet de mieux connaître les possibilités de survie de ces agents pathogènes, de préciser les conditions favorables au parasitisme et d'améliorer les méthodes de lutte directe ou indirecte notamment dans les sols.

BIBLIOGRAPHIE

1. COCHRANE (V. W.), 1963. — Physiology of Fungi. J. Wiley and sons Inc. New York.
2. ERWIN (D. C.), ZENTMEYER (G. A.), GALINDO (J.) and NIEDERHAUSER (J. S.), 1963. — Variation in the genus *Phytophthora*. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 1, 375-396.
3. FREZZI (M. J.), 1950. — Las especies de *Phytophthora* en la Argentina. *Revista de Invest. agric.*, IV, 1, 47-134.
4. FROSSARD (P.), 1965. — Une pourriture des racines de l'avocatier causée par *Phytophthora cinnamomi*, nouvelle en Côte-d'Ivoire. *C. R. Cong. prot. cult. trop.*, Marseille, 765-769.
5. GOUJON (M.), 1965. — Etude expérimentale du développement du thalle du *Trachysphaera fructigena* Tab. et Bunt. *Rev. Gén. Bot.*, 72, 353-412.

6. GOTTLIEB (D.), 1950. — The physiology of spore germination in fungi. *Bot. Rev.*, 16, 229-257.
7. GOTTLIEB (D.), 1964. — Germination of Fungus spores. *Endeavour*, 23, 85-89.
8. MERONUCK (R. A.), PEPPER (E. M.), 1968. — Chlamyospore formation in conidia of *Helminthosporium sativum*. *Phytopathology*, 58, 866-67.
9. MIRCETICH (S. M.), ZENTMEYER (G. A.), 1967. — Production of oospores and chlamyospores of *P. cinnamomi* in roots and soil. *Phytopathology*, 57, 100.
10. MIRCETICH (S. M.), ZENTMEYER (G. A.), ENDRICK (K. E.), 1968. — Physiology of germination of chlamyospores of *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology*, 58, 666-71.
11. MOREAU (F.), 1953. — Les champignons. Lechevalier édit., Paris.
12. MOREAU (C. et M.), 1952. — Etude mycologique de la maladie de l'encre du chêne. *Rev. Pathol. vég. Entom. Agr. Fr.*, XXXI, 201-231.
13. MOREAU (C. et M.), 1954. — Le dépérissement des agrumes en Côte-d'Ivoire. *Rev. de Mycol.* XIX, suppl. col. n° 2, 55-57.
14. PAPAVIZAS (G. C.), LEWIS (J. A.), ADAMS (P. B.), 1968. — Survival of root infecting fungi in soil. II, III, IV. *Phytopathology*, 58, 365-72, 73-77, 78-83.
15. PARK (D.), 1954. — Chlamyospores and survival in soil Fungi. *Nature*, 173, 545-55.
16. RAVISÉ (A.), 1968. — Etude expérimentale de l'incidence de la nutrition sur l'accomplissement du cycle de Pythiacées parasites de cultures tropicales. *C. R. Acad. Sci. Sér. D*, 267, 1821-24.
17. ROBINSON (P. M.), PARK (D.), 1966. — Volatile inhibition of spore germination produced by Fungi. *Trans. Brit. Myc. Soc.*, 49, 639-49.
18. ROGER (L.), 1953. — Phytopathologie des pays chauds. Tome I, Lechevalier, Paris.
19. SCHWINN (F. J.), 1959. — Untersuchungen zur Systematik der Gattung *Phytophthora* de Bary. *Archiv. für Mikrobiologie*, 33, 223-52.
20. SUSSMAN (A. S.), HALVORSON (H. O.), 1965. — Spores dormancy and germination. Ronald Press Cy, New York.
21. TSAO (P. H.), BRICKER (J. L.), 1968. — Germination of chlamyospores of *Phytophthora parasitica* in soil. *Phytopathology*, 58, 1070.
22. TUCKER (C. M.), 1931. — Taxonomy of the genus *Phytophthora* de Bary. *Missouri Agr. Expt. Sta. Res. Bull.*, 153, 1-208 (réédition Bibliotheca mycologica, 7, J. Cramer).
23. WAGER (V. A.), 1940. — Descriptions of the South Africa *Pythiaceae* with records of their occurrence. *Bothalia*, IV, 3-35.
24. WATERHOUSE (G. M.), 1963. — Key to the species of *Phytophthora* de Bary. *Mycological papers*, n° 92, ed. C.M.I. Kew.

(Laboratoire de Phytopathologie,
Centre O.R.S.T.O.M., Brazzaville, Congo.)